

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/019294

International filing date: 24 December 2004 (24.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2003-426601  
Filing date: 24 December 2003 (24.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 03 March 2005 (03.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

27.12.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 3 年 1 2 月 2 4 日  
Date of Application:

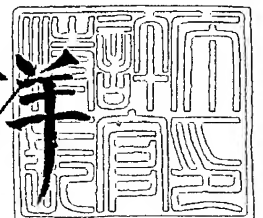
出 願 番 号            特 願 2 0 0 3 - 4 2 6 6 0 1  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [ J P 2 0 0 3 - 4 2 6 6 0 1 ]

出      願      人            塩野義製薬株式会社  
Applicant(s):

2 0 0 5 年    2 月 1 8 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川 洋



【書類名】 特許願  
【整理番号】 03P00086  
【提出日】 平成15年12月24日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 A61K 38/46  
C12N 15/09

【発明者】  
【住所又は居所】 兵庫県尼崎市杭瀬寺島 2 丁目 1 番 3 号 塩野義製薬株式会社内  
【氏名】 高倉 知朗

【発明者】  
【住所又は居所】 兵庫県尼崎市杭瀬寺島 2 丁目 1 番 3 号 塩野義製薬株式会社内  
【氏名】 野津 芳秀

【発明者】  
【住所又は居所】 兵庫県尼崎市杭瀬寺島 2 丁目 1 番 3 号 塩野義製薬株式会社内  
【氏名】 瀧本 明生

【特許出願人】  
【識別番号】 000001926  
【氏名又は名称】 塩野義製薬株式会社

【代理人】  
【識別番号】 100108970  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 山内 秀晃  
【電話番号】 06-6455-2056

【選任した代理人】  
【識別番号】 100113789  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 杉田 健一  
【電話番号】 06-6455-2056

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 044602  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1  
【包括委任状番号】 9720909  
【包括委任状番号】 9905998

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

システイン残基のメルカプト基にポリマーがエステル結合したタンパク質に、メルカプト基を有する化合物を反応させる工程を含む、該ポリマーの脱離方法。

**【請求項 2】**

システイン残基のメルカプト基にポリマーがエステル結合したタンパク質が、システイン残基を有するタンパク質に活性化ポリマーを反応させることにより得られたものである、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 3】**

該タンパク質が酵素である、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 4】**

該ポリマーがポリエチレングリコールである、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 5】**

該メルカプト基を有する化合物が、ジチオスレイトール、ジチオエリスリトール、2-メルカプトエタノール、還元型グルタチオン又はN-アセチル-L-システインである、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 6】**

該メルカプト基を有する化合物が、ジチオスレイトール又は2-メルカプトエタノールである、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 7】**

タンパク質 1 サブユニットあたり 0.7~1.3 分子のポリマーが脱離するものである、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 8】**

メルカプト基を有する化合物を反応させる前のポリマーが結合したタンパク質に比べて、ポリマーが脱離した後のタンパク質の機能を向上させるものである、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 9】**

請求項 1~8 のいずれかに記載の方法を使用する、ポリマーが結合したタンパク質の製造方法。

**【請求項 10】**

該タンパク質がメチオニナーゼである、請求項 9 記載のポリマーが結合したタンパク質の製造方法。

**【請求項 11】**

請求項 10 記載の方法で得られる、ポリマーが結合したメチオニナーゼ。

**【請求項 12】**

1 サブユニットあたり 3.1 個以上の遊離のメルカプト基を有するものである、ポリマーが結合したメチオニナーゼ。

**【請求項 13】**

請求項 11 または 12 に記載のメチオニナーゼを含有する抗腫瘍剤。

【書類名】明細書

【発明の名称】ポリマーが結合したタンパク質の製造法

【技術分野】

【0001】

本発明は、タンパク質のシステイン残基のメルカプト基にエステル結合したポリマーの脱離方法、該方法を使用するポリマーが結合したタンパク質の製造方法に関する。詳しくは、システイン残基のメルカプト基にポリマーがエステル結合したタンパク質に、メルカプト基を有する化合物を反応させる工程を含む、該ポリマーの脱離方法に関する。

【背景技術】

【0002】

一般的に、タンパク質そのものを医薬に使用する場合、血中半減期が短い、抗原性が高い、貯蔵安定性が悪い、溶解性が低い等の問題がある。

上記の問題を解決するためには、タンパク質にポリエチレングリコール等のポリマーを結合させることにより、血中半減期を長くしたり、抗原性を減少させたり、貯蔵安定性を改善できることが知られている（特許文献1）。

メチオニナーゼ（L-メチオニナーゼ）は、腫瘍細胞の増殖において必須であるメチオニンの量を減らし、健康な組織を害することなく、腫瘍細胞の増殖を選択的に抑制することができ、抗腫瘍効果を有することが知られている（特許文献2）。また、組換えメチオニナーゼ（特許文献3）、ポリエチレングリコールが結合したメチオニナーゼ（特許文献4）、アミノ酸置換により機能改変を施したメチオニナーゼも知られている。

【特許文献1】米国特許第4, 179, 337号

【特許文献2】特許第2930723号

【特許文献3】特許第3375834号

【特許文献4】特表2002-531050

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

一般に、ポリエチレングリコール等のポリマーが結合したタンパク質は、結合前のタンパク質に比較し機能が大きく低下していることが多く、医薬としての利用には適さない場合がある。こういった状況の下、タンパク質の機能を大きく低下させることなく、ポリマーが結合したタンパク質を製造する方法が求められていた。

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明者は、タンパク質の例としてメチオニナーゼを用いて、ポリマーが結合したメチオニナーゼの製造法の検討を行い、1)メチオニナーゼにポリエチレングリコールを結合させた場合に活性が大きく低下すること、2)その活性低下はメチオニナーゼ中のシステイン残基のメルカプト基へのポリマーのエステル結合に起因すること、3)該エステル結合はジチオスレイトール等で選択的に切断できること、4)ポリエチレングリコールを結合させたメチオニナーゼをジチオスレイトール等で処理した後の活性は、ジチオスレイトール等で処理する前の活性よりも約1.5~4倍高いこと、5)その活性はオリジナルのメチオニナーゼの活性の約70%以上であることを見出した。

【0005】

上記の知見に基づいて、本発明者は、以下の発明を完成した。

(1) システイン残基のメルカプト基にポリマーがエステル結合したタンパク質に、メルカプト基を有する化合物を反応させる工程を含む、該ポリマーの脱離方法。

(2) システイン残基のメルカプト基にポリマーがエステル結合したタンパク質が、システイン残基を有するタンパク質に活性化ポリマーを反応させることにより得られたものである、上記(1)記載の方法。

(3) 該タンパク質が酵素である、上記(1)記載の方法。

(4) 該ポリマーがポリエチレングリコールである、上記(1)記載の方法。

(5) 該メルカプト基を有する化合物が、ジチオスレイトール、ジチオエリスリトール、2-メルカプトエタノール、還元型グルタチオン又はN-アセチル-L-システインである、上記(1)記載の方法。

(6) 該メルカプト基を有する化合物が、ジチオスレイトール又は2-メルカプトエタノールである、上記(1)記載の方法。

(7) タンパク質1サブユニットあたり0.7~1.3分子のポリマーが脱離するものである、上記(1)記載の方法。

(8) メルカプト基を有する化合物を反応させる前のポリマーが結合したタンパク質に比べて、ポリマーが脱離した後のタンパク質の機能を向上させるものである、上記(1)記載の方法。

(9) 上記(1)~(8)のいずれかに記載の方法を使用する、ポリマーが結合したタンパク質の製造方法。

(10) 該タンパク質がメチオニナーゼである、上記(9)記載のポリマーが結合したタンパク質の製造方法。

(11) 上記(10)記載の方法で得られる、ポリマーが結合したメチオニナーゼ。

(12) 1サブユニットあたり3.1個以上の遊離のメルカプト基を有するものである、ポリマーが結合したメチオニナーゼ。

(13) 上記(11)または(12)に記載のメチオニナーゼを含有する抗腫瘍剤。

#### 【発明の効果】

##### 【0006】

本発明の方法により、タンパク質のシステイン残基のメルカプト基にエステル結合したポリマーを脱離することができる。本発明を使用することにより、タンパク質の機能を大きく低下させることなく、ポリマーが結合したタンパク質を製造することができる。本発明を使用して得られるポリマーが結合したタンパク質は、血中半減期が長く、抗原性が低減されており、貯蔵安定性も改善されているのみならず、薬理活性も高く、医薬品として有用である。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0007】

本発明は、システイン残基のメルカプト基にポリマーがエステル結合したタンパク質に、メルカプト基を有する化合物を反応させることにより行うことができる。

本発明に用いられるタンパク質は、システイン残基を有するタンパク質を意味し、例えば、そのアミノ酸配列中にシステインを含むタンパク質を意味する。なお、タンパク質としては、アミノ酸残基数が10以上のものが好ましく、分子量としては1,000以上のものが好ましい。そのようなタンパク質としては、例えば、メチオニナーゼ、パパイン、キモパパイン、カテプシン、トランスグルタミナーゼ、プロテアーゼ、ケラチン、ヘモグロビン、アルブミン、メタロチオネイン等が挙げられる。メチオニナーゼは、抗腫瘍活性を有することが知られており、サブユニット分子量は約43 kDaのホモテトラマーである。なお、本発明に用いられるタンパク質は、天然物から単離精製したものでもよく、遺伝子組換え技術により作成されたものでもよい。

また、タンパク質としては酵素が好ましい。例えば、メチオニナーゼ、パパイン、キモパパイン、カテプシン、トランスグルタミナーゼ等が挙げられる。

##### 【0008】

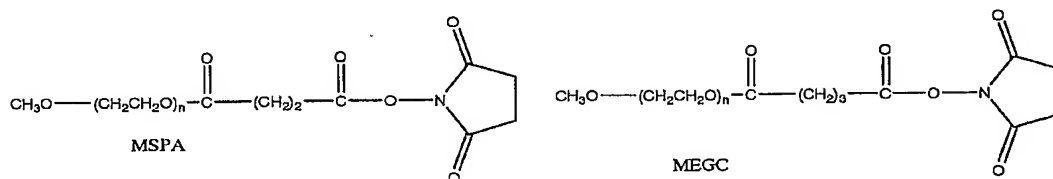
システイン残基のメルカプト基にポリマーがエステル結合したタンパク質は、例えば、システイン残基を有するタンパク質に活性化ポリマーを反応させることにより得ることができる。

活性化ポリマーは、タンパク質中のアミノ基やメルカプト基にポリマーを結合させるために使用される。活性化ポリマーは、市販の物を使用してもよいし、市販のポリマーを活性化して調整してもよい。例えば、活性エステルに誘導されたポリマー等が使用できる。ポリマーにカルボキシル基がある場合は、該カルボキシル基を活性エステルにすればよい。また、ポリマーにカルボキシル基がない場合であっても、カルボキシル基を有するリン

カーを結合させ、該カルボキシ基を活性エステルにすればよい。リンカーとしては、通常使用されるものであればよく、好ましくは、炭素数 1 ~ 20、さらに好ましくは炭素数 2 ~ 5 ぐらいのリンカーが使用される。

例えば、メトキシポリエチレングリコール等はUnion Carbide Corporationから入手できる。ポリマーの活性化は、N-ヒドロキススルホニイミド (NHS) 等を用いて行うことができる。例えば、メトキシポリエチレングリコールスルホニイミジルプロピオネート (MSPA)、メトキシポリエチレングリコールスルホニイミジルグルタレート (MEGC) 等が挙げられる。

【化1】



(上記式中、 $n$ は任意の整数。好ましくは、50～1000。)

ポリマーとしては、デキストラン、ポリ(N—ビニル)ピロリドン、ポリアルキレンオキシド、ポリオキシエチレンポリオール、ポリオレフィンアルコール、ポリアクリルモルファン等が例示される。特にポリアルキレンオキシドが好ましい。

ポリアルキレンオキシドとしては、 $\alpha$ 置換ポリアルキレンオキシド誘導体、ポリエチレングリコールホモポリマー、ポリプロピレングリコールホモポリマー、アルコキシポリエチレンオキシド、ビス-ポリエチレンオキシド、ポリ（アルキレンオキシド）のコポリマー、またはポリ（アルキレンオキシド）若しくはその活性化誘導体のブロックコポリマー等が挙げられる。特に、アルコキシポリエチレンオキシドが好ましい。

アルコキシポリアルケンオキシドとしては、アルコキシポリエチレングリコール（例えば、メトキシポリエチレングリコール等）、アルコキシポリエチレンオキシド、アルコキシポリプロピレンオキシドが挙げられる。特に、メトキシポリエチレングリコールが好ましい。

ポリマーは、約200～約50,000ドルトンの平均分子量を有するポリマーを使用することができる。好ましくは、約1,000～約20,000ドルトンの平均分子量を有するポリマー、さらには、約2,000～約10,000ドルトンの平均分子量を有するポリマー、最も好ましくは、約4,000～約6,000ドルトンの平均分子量を有するポリマーである。

ポリマーの形状としては直鎖状でも分岐状でもまた櫛状でも構わない。

使用する活性化ポリマーの量は、使用するタンパク質により異なる。すなわち、タンパク質中のアミノ基やメルカプト基の数等により影響を受ける。例えば、タンパク質がメチオニナーゼの場合、4つのサブユニットからなる4量体であり、各サブユニットは10個のアミノ基(N末端アミノ基も含む)と4個のメルカプト基を有する。メチオニナーゼに対し、30モル等量の活性化ポリマーを使用した場合、各サブユニット当たり4~6個程度のポリマーが結合する。また、60モル等量の活性化ポリマーを使用した場合、各サブユニット当たり7~10個程度のポリマーが結合する。

【0009】

【0009】  
本発明の方法によりポリマーが結合したタンパク質を調製するには、まず、ポリマー（例えば、アルキルポリエチレングリコール）をタンパク質に結合させる。次に、ポリマーが結合したタンパク質に、メルカプト基を有する化合物を反応させ、タンパク質のシステイン残基のメルカプト基にエステル結合したポリマーを脱離させることにより、目的の組成物を得る。

具体的には、以下のように製造することができる。ポリマーにカルボキシル化剤を反応

させ、カルボキシル基をポリマーに導入する。そのカルボキシル基が導入されたポリマーにカルボキシル基活性化剤を反応させ、ポリマーの活性エステル体を製造する。最後に、該活性エステル体にタンパク質を反応させることにより、ポリマーが結合したタンパク質を得ることができる。例えば、特表昭62-501449、特開平10-87815等を参考にしてもよい。

なお、タンパク質に結合するポリマー分子の数は、活性基、例えば、タンパク質分子上に存在する反応基、例えばアミノ基、メルカプト基の数により変動する。また、タンパク質とポリマーを反応させる時の条件、例えば温度、pH、タンパク質濃度等によっても変動する。ここで得られるポリマーが結合したタンパク質は、ポリマーが結合していないタンパク質に比べて、半減期が長く、免疫抗原性が少ないというメリットを有するが、活性については弱くなる場合が多い。

上記のようにして得られたポリマーが結合したタンパク質に、メルカプト基を有する化合物を反応させ、タンパク質のシステイン残基のメルカプト基にエステル結合したポリマーを脱離させることにより、ポリマーが結合したタンパク質を含む組成物を得ることができる。

メルカプト基を有する化合物は、遊離のメルカプト基を有する化合物であればよく、特に低分子化合物が好ましい。例えば、ジチオスレイトール、ジチオエリスリトール、還元型グルタチオン、N-アセチル-L-システイン、2-メルカプトエタノール等が挙げられ、特に、ジチオスレイトール、還元型グルタチオン、N-アセチル-L-システイン、2-メルカプトエタノールが好ましい。

使用するメルカプト基を有する化合物の量は、反応溶液の重量に対して0.01~10重量%程度が好ましい。

#### 【0010】

以下に、メトキシポリエチレングリコールのメチオニナーゼへの結合方法を説明する。約1,000~約20,000、好ましくは約2,000~約10,000、そして最も好ましくは約4,000~約6,000ダルトンの平均分子量を有するメトキシポリエチレングリコールを、無水コハク酸、好ましくは無水グルタル酸を用いて、コハク酸化またはグルタル酸化する。続いて、好ましくはN-ヒドロキシスクシンイミドを用いて、活性化メトキシポリエチレングリコールを得る。最後に、活性化メトキシポリエチレングリコールをメチオニナーゼと反応させる。

#### 【0011】

以下に、メトキシポリエチレングリコールが結合したメチオニナーゼをメルカプト基を有する化合物で処理する工程を説明する。メトキシポリエチレングリコールが結合したメチオニナーゼ1分子に対し、約1~200モル等量のメルカプト基を有する化合物を、4~50度、好ましくは10~40度で反応させる。この時、反応溶媒としては、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドなどを使用することができる。反応時間は、10分~4時間、好ましくは30分~2時間である。

得られた反応液から目的のメトキシポリエチレングリコールが結合したメチオニナーゼを単離精製するには、タンパク質を精製する通常の方法が用いられる。すなわち、沈殿、膜分離、カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、結晶化などが用いられる。

#### 【0012】

メチオニナーゼに関し、ポリマーを結合させる前と後、メルカプト基を有する化合物で処理する前と後の比較を行った。

まず、ポリマーを結合させる前のメチオニナーゼのメルカプト基の数を測定した。理論的には、1サブユニット当たり4つのメルカプト基があるが、実測値は、約3.7個/サブユニットであった。次に、ポリマーを結合させた後のメチオニナーゼのメルカプト基の数を測定した。その結果、メルカプト基の数は、約2.7個/サブユニットであった。

次に、メルカプト基を有する化合物で処理した後のメチオニナーゼのメルカプト基の数を測定した。その結果、メルカプト基の数は、約3.7個/サブユニットであった。



本方法により、タンパク質 1 サブユニットあたり約 1 分子（例えば、0.7～1.3 分子）のポリマーを脱離させることができる。これは、反応させる活性化ポリマーの量を、メチオニナーゼに対して 30 モル等量使用した場合も、60 モル等量使用した場合もほぼ同じであった。これらの結果から、ポリマーを結合させると、メチオニナーゼのサブユニット当たり 4 つ存在するメルカプト基のうち、1 つのメルカプト基がポリマーとエステル結合していたことがわかる。さらにポリマーが結合したメチオニナーゼをメルカプト基を有する化合物で処理すると、そのメルカプト基にエステル結合したポリマーが脱離することがわかった。また、メルカプト基を有する化合物による処理では、メチオニナーゼのアミノ基にアミド結合しているポリマーは脱離しないことも確認した。

これらのことから、本発明の方法により得られるポリマーが結合したメチオニナーゼは、メルカプト基が 4 個/サブユニットである、ポリマーが結合したメチオニナーゼからなる組成物であるといえる。また、本方法により得られるポリマーが結合したメチオニナーゼは、例えば Ellman 法 (G.L. Ellman et. al., Arch. Biochem. Biophys., 82, 70-77 (1959)) により測定すると、1 サブユニットあたり 2.8 個以上、好ましくは 3.1 個以上、さらに好ましくは 3.5 以上の遊離のメルカプト基を有すると言える。

#### 【0013】

さらに、メチオニナーゼに関して、ポリマーを結合させる前と後、メルカプト基を有する化合物で処理する前と後の比較を行った。詳細は後述の実施例で説明するが、ポリエチレングリコールを結合させたメチオニナーゼをジチオスレイトール等で処理した後の活性は、ジチオスレイトール等で処理する前の活性よりも約 1.5～4 倍高い。すなわち本方法は、メルカプト基を有する化合物を反応させる前のポリマーが結合したタンパク質に比べて、ポリマーが脱離した後のタンパク質の機能を向上させるものであると言える。ここでタンパク質の機能とは、酵素活性、レセプター活性等を意味する。

#### 【0014】

なおメチオニナーゼに関し、そのアミノ酸配列の 116 番目のシステイン残基が、活性との関係で重要であることが示唆されている (Hiroyuki Tanaka et. al. J. Biochemistry, 117, 1120-1125 (1995)、Toru Nakayama, et. al., Agric. Biol. Chem., 52, 177-183, (1988))。上記の結果をこの報告と共に考えると、メチオニンの 116 番目のシステインにエステル結合したポリマーが、メルカプト基を有する化合物で処理することにより、脱離した可能性が高いと言える。すなわち、本発明の方法により得られたポリマーが結合したメチオニナーゼは、116 番目のアミノ酸が遊離のメルカプト基である、ポリマーが結合したメチオニナーゼからなる組成物である可能性が高い。

#### 【0015】

本発明の方法により得られるポリマーが結合したメチオニナーゼは、腫瘍細胞の増殖を効果的に抑制することができ、結腸、乳房、前立線、卵巣、腎臓、咽頭、黒色腫、肉腫、肺、脳、胃、膀胱等の癌の治療および/または予防等に有用である。すなわち、本発明を使用して得られたメチオニナーゼを含有する抗腫瘍剤は、抗原性が低いのみならず、高い活性を保持しており、医薬として有用である。

#### 【0016】

本発明により得られたポリマーが結合したタンパク質を医薬として投与する場合、経口的、非経口的のいずれの方法でも投与することができる。経口投与は常法に従って錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤、丸剤、液剤、シロップ剤、バツカル剤または舌下剤等の通常用いられる剤型に調製して投与すればよい。非経口投与は、例えば筋肉内投与、静脈内投与等の注射剤、坐剤、経皮吸収剤、吸入剤等、通常用いられるいずれの剤型でも好適に投与することができる。例えば、本発明の方法により得られるポリマーが結合したメチオニナーゼは、点滴静注等に使用することができる。

#### 【0017】

本発明により得られるポリマーが結合したタンパク質の有効量にその剤型に適した賦形剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、滑沢剤、希釈剤等の各種医薬用添加剤とを必要に応じて混合し医薬製剤とすることができる。注射剤の場合には適当な担体と共に滅菌処理を行なっ

て製剤とすればよい。

具体的には、賦形剤としては乳糖、白糖、ブドウ糖、デンプン、炭酸カルシウムもしくは結晶セルロース等、結合剤としてはメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチンもしくはポリビニルピロリドン等、崩壊剤としてはカルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンテン末もしくはラウリル硫酸ナトリウム等、滑沢剤としてはタルク、ステアリン酸マグネシウムもしくはマクロゴール等が挙げられる。坐剤の基剤としてはカカオ脂、マクロゴールもしくはメチルセルロース等を用いることができる。また、液剤もしくは乳濁性、懸濁性の注射剤として調製する場合には通常使用されている溶解補助剤、懸濁化剤、乳化剤、安定化剤、保存剤、等張剤等を適宜添加しても良く、経口投与の場合には矯味剤、芳香剤等を加えても良い。

例えば、本発明の方法により得られるポリマーが結合したメチオニナーゼは、凍結乾燥して使用してもよい。

#### 【0018】

本発明により得られるポリマーが結合したタンパク質の医薬としての投与量は、患者の年齢、体重、疾病の種類や程度、投与経路等を考慮した上で設定することが望ましいが、成人に経口投与する場合、通常  $0.05 \sim 200 \text{ mg/kg/day}$  であり、好ましくは  $0.1 \sim 100 \text{ mg/kg/day}$  の範囲内である。非経口投与の場合には投与経路により大きく異なるが、通常  $0.005 \sim 20 \text{ mg/kg/day}$  であり、好ましくは  $0.01 \sim 10 \text{ mg/kg/day}$  の範囲内である。これを1日1回～数回に分けて注射、もしくは点滴で投与すれば良い。なお、これらの投与量は、タンパク質の種類により異なる。従って、上記の投与量の範囲外であっても使用することができる。

#### 【実施例1】

##### 【0019】

以下に、タンパク質として組換えメチオニナーゼ（以下、rMETaseと記載することもある）を使って、本発明を説明する。なお、本発明は実施例に限定されるものではない。ジチオスレイトール（DTT）処理ポリエチレングリコール修飾組換えメチオニナーゼ（PEG-rMETase）の製造法

##### 1) rMETase

特願平 9-270676に準じて実施取得した。

##### 2) rMETase濃縮・調整工程

約170 gのrMETaseに120 mM ホウ酸ナトリウム緩衝液（pH 9.0）を2倍量加え混合した。次に分画分子量10 kDa,  $1.8 \text{ m}^2$ の膜を用いて100 g/Lまで濃縮した。濃縮した150 gのrMETaseを、PEG修飾工程へ用いた。

##### 3) PEG修飾、DTT処理工程

150 gのrMETaseに活性化PEG（MEGC-50HS、日本油脂製）275.4 gを3回（ $91.8 \text{ g} \times 3$ ）に分けて37℃恒温下で10～15分毎に添加した。3回目の添加から10～15分反応後に100 mM リン酸水素二ナトリウム溶液でpHを7.2に調整した。DTTを0.5%濃度になるように添加し、37℃恒温下で2時間攪拌し、反応を行い、15℃で一夜保存した。

##### 4) Diafiltration工程

得られた反応液を総量が36.0 Lとなるように50 mMリン酸ナトリウム緩衝液pH 7.2を加え混合した。42 Lの50 mMリン酸ナトリウム緩衝液pH 7.2を  $0.7 \text{ L/min}$ の流速で添加しながら分画分子量50 kDa,  $2.1 \text{ m}^2$ の膜を用いてDiafiltrationを行った。引き続き約3 Lになるまで濃縮を行った。2 Lの50 mMリン酸ナトリウム緩衝液pH 7.2を用いて膜内のタンパク質を回収し濃縮液と混合してDiafiltration処理液とした。

##### 5) イオン交換カラムクロマトグラフィー工程

50 mMリン酸ナトリウム緩衝液pH 7.2で平衡化されたDEAE Sepharose-FFカラム（ $\phi 140 \times 65 \text{ mm}$ , 1 L）にDiafiltration処理液を50 cm/hの流速で送液し、pass through画分を取

得した。溶出液に50 mMりん酸ナトリウム緩衝液pH 7.2を添加し12.0 Lに調整し、 $0.2\mu\text{m}$ 、 $0.05\text{ m}^2$ の膜でろ過して15℃で保存した。

#### 6) ゲル濾過工程

10 mMりん酸ナトリウム緩衝液pH 8.0で平衡化されたSephacryl S200 HRカラム ( $\phi 600 \times 600\text{ mm}$ , 170 L) にイオン交換カラムクロマトグラフィー溶出液を11 cm/hの流速で送液した。活性画分を集めて30 kDa,  $1.2\text{ m}^2$ の膜を用いて濃縮を行った。約1 Lの 10 mMりん酸ナトリウム緩衝液pH 8.0を用いて膜内のタンパク質を回収し、さらに10 mMりん酸ナトリウム緩衝液を添加しタンパク質濃度が約40 g/Lになるよう調整した。

#### 7) ピリドキサルりん酸 (PLP) 添加工程

濃縮液に1 mM濃度に調製したPLP溶液を濃縮液量の1/9量添加して混合後、滅菌済み $0.22\mu\text{m}$ ,  $0.02\text{ m}^2$ の膜を用いて約200 mLずつ容量250 mLのボトルに分注し-80℃で保存した。

### 【実施例 2】

#### 【0 0 2 0】

DTT処理による比活性の上昇 (メチオニナーゼ)

DTT処理を施していないPEG-rMETaseおよびrMETase、DTT処理を施したPEG-rMETaseおよびrMETaseの比活性を測定した。活性測定は特願平 9-270676に基づき実施した。その結果、表1に示すようにPEG修飾を行うことで比活性の大幅な減少が認められたが、DTT処理を施すことにより大幅に回復した。

【表 1】

PEG-rMETase 比活性に及ぼす DTT 処理の効果 (反応モル比 60)

	DTT 処理	比活性 (U/mg)
rMETase	—	56
	+	56
PEG-rMETase	—	16
	+	44

#### 【0 0 2 1】

次に、MEGC-50HSとは分子量の異なる活性化PEG (日本油脂製) を用いて反応モル比30で同様の実験を行った。その結果、表2に示すように異なる分子量の活性化PEGでもDTT処理を施すことで比活性の回復が認められた。

【表 2】

分子量の異なる活性化 PEG を用いて作製した PEG-rMETase の比活性に及ぼす DTT 処理の効果

	活性化 PEG 分子量	DTT 処理	比活性 (U/mg)
MEGC-50HS	5 kDa	—	33
		+	45
MEGC-10TS	10 kDa	—	32
		+	47
MEGC-20TS	20 kDa	—	33
		+	47

#### 【0 0 2 2】

さらにMEGC-50HSとはリンカーが異なる他のPEG修飾剤 (MSPA5000, NEKTAR製) と活性部位が異なる他のPEG修飾剤 (MENP-50H, 日本油脂製) を用いて反応モル比30で同様の実験を行ったところ、表3に示すように他のPEG修飾剤でもDTT処理を施すことで比活性の回復が認められた。

【表 3】

リンカーおよび活性部位が異なる活性化 PEG を用いて作製した PEG-rMETase の比活性に及ぼす DTT 処理の効果

	リンカー	活性部位	DTT 処理	比活性 (U/mg)
MEGC-50HS	Glutaryl	NHS	—	33
			+	45
MSPA5000	Propionyl	NHS	—	33
			+	38
MENP-50H	Carbonyl	p-ラニトロフェノール	—	10
			+	30

## 【0023】

メチオニナーゼ以外のタンパク質とMEGC-50HSとの反応におけるDTT処理の効果

パパイン（和光純薬製）を用いて、同様にPEG化反応とDTT処理を行い、その比活性を比較した。パパインの活性評価は0.1 mM L-システイン、2 mM EDTA・2Na、および1 mM N- $\alpha$ -ベンゾイル-DL-アルギニン-p-ニトロアニリド塩酸塩を含む50 mM トリス塩酸緩衝液中（pH 7.5）で反応を行い、37℃で1分間に生成するp-ニトロアニリンの量を410 nmでモニターし測定した。その結果、表4に示すようにPEG化により比活性は大幅に減少したが、DTT処理を施すことにより回復することが判明した。

【表 4】

PEG 化パパインに及ぼす DTT 処理の効果

	相対比活性 (%)
Papain	100
PEG 化反応	42
DTT 処理	106

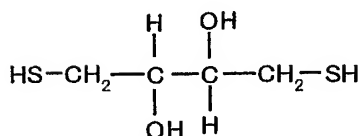
以上のことからDTT処理による効果はrMETaseに限定されたものではないと言える。

## 【実施例 3】

## 【0024】

DTTは下に示すようにSH基と水酸基を保有する。

## 【化 2】



DTT処理による比活性上昇がSH基と水酸基のいずれに起因するのか調べた。SH基を保有する化合物（ジチオスレイトール、還元型グルタチオン、N-アセチル-L-システイン、2-メルカプトエタノール）、および水酸基を保有するアルコール（メタノール、エタノール、メトキシエタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール、2-メチル-1-プロパノール）について、従来の方法で得られたPEG-rMETaseと反応させ、比活性を比較した。その結果、表5に示すように、SH基を保有する化合物と接触させた場合のみ比活性の回復が確認され、DTT処理による比活性上昇はSH基に起因していることが示唆された。

【表 5】

PEG-rMETase の比活性回復に影響を及ぼす化合物

化合物	相対比活性 (%)
<i>N</i> -Acetyl L-cysteine	79
Glutathione(還元型)	55
2-Mercaptoethanol	70
Dithiothreitol	100
Methanol	5
Ethanol	4
Methoxyethanol	4
1-Propanol	4
2-Propanol	4
1-Butanol	5
2-Butanol	1
2-Methyl-1-propanol	5
No addition	5

酵素溶液は DTT を含まない緩衝液を用いて調製

## 【実施例 4】

## 【0025】

## 残存SH基の定量

rMETaseはサブユニットあたり4つのSH基を有している。rMETase中に存在するフリーSH基量をSDS処理した変性系でEllman法を用いて定量した。

その結果、表6に示すように活性化PEG (MEGC-50HS) と反応させる前のrMETaseは3.7 SH/サブユニットあったが、PEG化反応で2.7 SH/サブユニットとなり1 SHの減少が認められた。次に0.5%DTTで処理したところPEG-rMETaseの残存SH基は3.7 SH/サブユニットへ回復し、rMETaseと同等の値となった。

さらに、従来の方法で得られたPEG化反応液を二分割し、DTT処理したものと未処理のものを調整し、残存SH基を定量した結果、表7に示すようにDTT未処理PEG-rMETaseは3.0 SH/サブユニット、DTT処理PEG-rMETaseは3.7 SH/サブユニットとなり製造工程における推移とほぼ同等の値を示した。

これによりPEG化工程で平均して1つのSH基が活性化PEG (MEGC-50HS) と反応するが、DTT処理により遊離されたと考えることができる。また、PEGが遊離したCysは活性に重大な影響を与える部位であると推測された。

【表 6】

DTT 処理 PEG-rMETase 製造工程における SH 基の推移

工程	SH/subunit
rMETase	3.7
PEG 化反応液 (反応モル比 60)	2.7
DTT 処理 PEG-rMETase	3.7

【表 7】

DTT 未処理/処理 PEG-rMETase の残存 SH 基	
PEG-rMETase(反応モル比 60)	SH/subunit
DTT 処理	
—	3.0
+	3.7

## 【実施例 5】

## 【0026】

モノヨード酢酸 (MIA) を用いた Cys の修飾

rMETase、DTT 未処理 PEG-rMETase、DTT 処理 PEG-rMETase を MIA と反応させ、SH 基を修飾した。結果を表 8 に示す。SH 基を修飾することでいずれも比活性は大幅に減少した。その後、DTT を添加して反応させた結果、DTT 未処理 PEG-rMETase のみ比活性の上昇が認められた。DTT 未処理 PEG-rMETase は活性に関与する Cys が PEG によって予め修飾されていたため、MIA による影響を受けず、DTT 処理を施すことによって PEG が脱離し比活性が上昇したのと思われる。

【表 8】

MIA 処理を施した rMETase、DTT 未処理 PEG-rMETase、DTT 処理 PEG-rMETase の比活性に及ぼす DTT 処理の影響

	比活性 (U/mg)		
	rMETase	DTT 未処理 PEG-rMETase	DTT 処理 PEG-rMETase
MIA 反応前	54	17	38
MIA 反応後	2.4	3.8	4.0
DTT 処理	2.7	12	4.6

## 【0027】

rMETase を活性化 PEG と反応させることで大幅な比活性の減少が生じるが、DTT 処理することで大幅に回復した。rMETase の Cys が活性発現に関与する重要因子であるとの報告もあることから PEG が Cys を修飾していることが推測された。Cys への PEG 修飾の可能性に関して検討した結果、DTT 以外の SH 基含有化合物でも比活性の上昇が認められた。rMETase の SH 基数は 3.7 SH/サブユニットであったが、PEG 化反応で 2.7 SH/サブユニットに低下した。その後、DTT 処理を施すことによって 3.7 SH/サブユニットに回復した。

MIA により SH 基を修飾することで比活性の大幅な減少が認められたが、DTT 処理を施すことにより DTT 未処理 PEG-rMETase のみ比活性が上昇した。

以上の結果より、活性化 PEG (MEGC-50HS) は rMETase 中の活性発現に重要な役割を果たす SH 基 (Cys) を修飾すると結論できる。

## 【実施例 6】

## 【0028】

PEG-rMETase の結合 PEG 数の定量 (MALDI-TOF/MS)

DTT 未処理 PEG-rMETase および DTT 処理 PEG-rMETase のサブユニットレベルでの絶対分子量を MALDI-TOF/MS で分析した。その結果、図 1 に示すように DTT 未処理 PEG-rMETase に対して DTT 処理 PEG-rMETase は分子量が約 5 kDa 低下していることが判った。PEG の分子量が約 5 kDa であることから DTT 処理により 1 PEG/サブユニットが脱離したことが考えられた。

## 【実施例 7】

## 【0029】

PEG-rMETase の結合 PEG 数の定量 (HPLC)

DTT未処理PEG-rMETase、DTT処理PEG-rMETaseの結合PEG数を測定した (John Bullock et al., Anal. Biochem., 254, 254-262, (1997))。アルカリ加水分解により遊離したPEGをPEG4120を標準とした定量法によってHPLCで測定した。その結果、表9に示すようにDTT未処理PEG-rMETaseの場合8.4 PEG/サブユニットであったのに対して、DTT処理PEG-rMETaseの場合は7.5 PEG/サブユニットであり、約1 PEG/サブユニットの低下が認められた。また、反応モル比30でも同様の結果が得られており、DTT処理により結合PEG数は約1 PEG/サブユニット低下していた。

【表 9】

PEG-rMETase における結合 PEG 数

PEG-rMETase DTT 処理	反応モル比 60 PEG/subunit	反応モル比 30 PEG/subunit
—	8.4	5.0
+	7.5	4.1

## 【実施例 8】

## 【0030】

フルオレスカミンによるアミノ基修飾率の測定

Fluorescamine法 (Laurel J. Karr et.al., Methods in Enzymology, 228, 377-390(1994)) によりDTT未処理PEG-rMETase、およびDTT処理PEG-rMETaseのアミノ基修飾率をrMETaseを対象として測定した。その結果、表10に示すようにDTT処理の有無に関わらずアミノ基修飾率はほぼ同等であった。従ってアミノ基に結合したPEGはDTT処理に伴う脱離は生じないことを確認した。

【表 10】

PEG-rMETase におけるアミノ基修飾率

PEG-rMETase(反応モル比 60) DTT 処理	修飾率 (%)
—	75
+	74

## 【0031】

DTT処理を施した結果、PEG-rMETaseサブユニットあたり約1 SH基の増加、約1 PEG分子分の絶対分子量の減少、および約1 PEG分子の脱離が認められた。しかしながらアミノ基修飾率は不変であった。これらのことより、DTT処理を行うことでSH基に修飾したPEGのみの脱離したと結論できる。

## 【0032】

以上のことからPEG化工程において、PEGが活性発現に重要な役割を果たすCysと不安定なチオエステル結合を形成して比活性を低下させるが、DTT処理を施すことにより交換反応が起こり、SH基の回復したPEG-rMETaseが生じると考えられる。

## 【実施例 9】

## 【0033】

反応モル比60で調製されたDTT処理PEG-rMETaseとDTT未処理PEG-rMETaseを同一タンパク質量 (140 mg/kg) マウス尾静脈に注射した(各群3匹)。経時的に採血し、血漿中のメチオニン濃度を測定した(Cynthia L. D. et.al., J. Chromatogr. B, 751, 383-387 (2001))。結果を図2に示す。DTT処理PEG-rMETase (○) はDTT未処理PEG-rMETase (□) と比較して血漿中のメチオニン濃度を長期間低レベルに維持し、DTT処理の効果をin vivoで確認することができた。さらに、PLP溶液を含有したポンプをマウス皮下に移植して同様の実験を行った場合の結果を図3に示す。DTT処理PEG-rMETase (●) はDTT未処理PEG-rMETase (■

）と比較して血漿中のメチオニン濃度を長期間低レベルに維持することができた。DTT処理を施すことにより、治療に必要な投与量の低減が可能と想定された。

#### 【実施例 1 0】

##### 【0 0 3 4】

反応モル比60で調製されたDTT処理PEG-rMETaseとrMETaseの抗原性を比較した。マウスにDTT処理PEG-rMETaseまたはrMETaseを0.1 mg/匹の用量で1週間に1回、合計12回腹腔内投与し、最終投与後2週間目に採血し血清を得た（各群10匹）。抗原性は酵素免疫測定法を用いて測定した。rMETaseをポリスチレン製プレートのウェルに固定化し、ブロッキング、洗浄した。希釈した血清をウェルに添加、洗浄した後、パーオキシダーゼ標識したマウス抗IgM抗体または抗IgG抗体を添加した。rMETaseまたはPEG-rMETaseを投与していないマウス血清をコントロールとして用い、力価を測定した。各血清希釈倍率における個体数を表11に示した。DTT処理PEG-rMETaseの抗原性はrMETaseよりも大幅に低下していた。

【表 1 1】

抗体クラス	抗原	希釈倍率(Log)							
		0	1	2	3	4	5	6	7
Ig M	RMETase	0	0	3	6	1	0	-	-
	DTT 処理 PEG-rMETase	8	0	1	1	0	0	-	-
Ig G	RMETase	0	0	0	0	4	4	2	0
	DTT 処理 PEG-rMETase	0	0	6	1	1	2	0	0

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【0 0 3 5】

【図 1】 MALDI-TOF/MSを用いたDTT未処理PEG-rMETaseおよびDTT処理PEG-rMETaseのサブユニットレベルでの絶対分子量測定結果を示す図である。

【図 2】 DTT処理PEG-rMETase (○) またはDTT未処理PEG-rMETase (□) をマウス尾静脈に注射した後の血漿中メチオニン濃度の経時変化を示す図である。

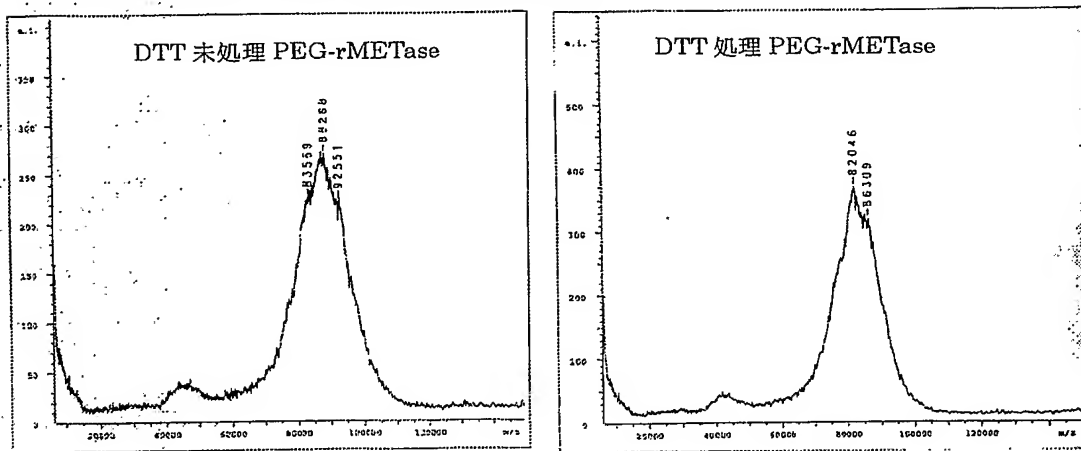
【図 3】 PLP溶液を含有したポンプをマウス皮下に移植し、DTT処理PEG-rMETase (●) またはDTT未処理PEG-rMETase (■) を投与した後の血漿中メチオニン濃度の経時変化を示す図である。



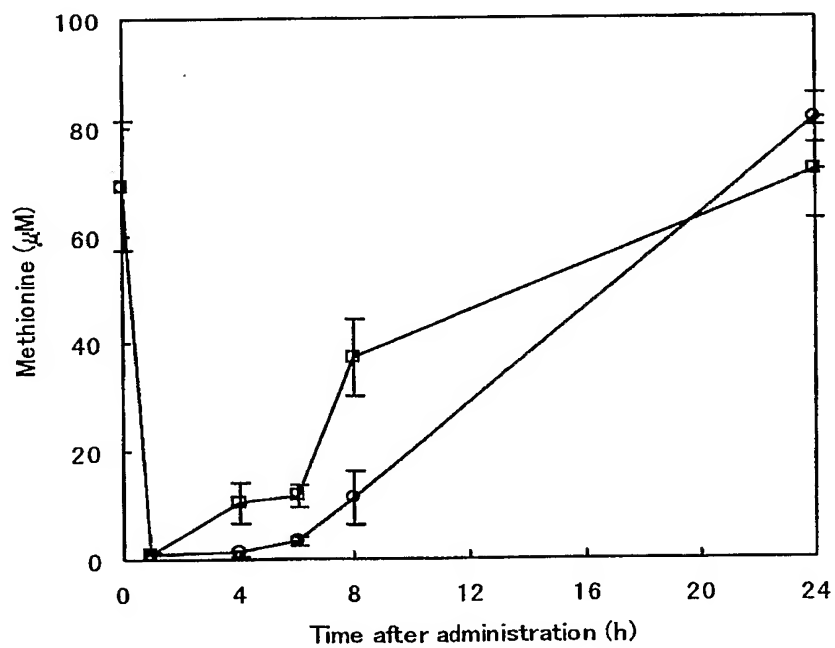
【書類名】 図面

【図 1】

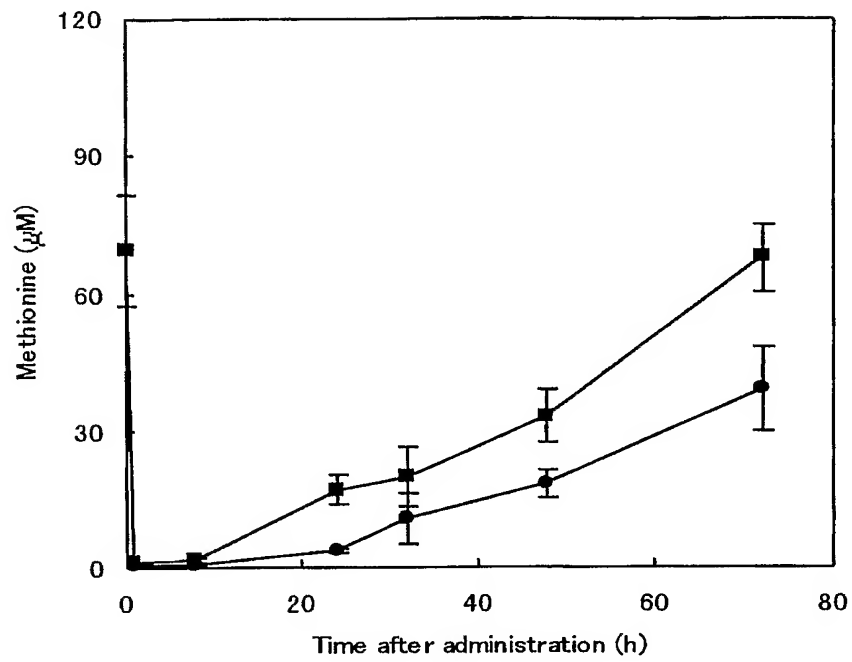
MALDI-TOF/MS による PEG-rMETase 分析



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 タンパク質の機能を大きく低下させることなく、ポリマーが結合したタンパク質を製造する。

【解決手段】 システイン残基のメルカプト基にポリマーがエステル結合したタンパク質に、メルカプト基を有する化合物を反応させることにより、該ポリマーを脱離させることにより、タンパク質の機能を大きく低下させることなく、ポリマーが結合したタンパク質を製造することができる。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 4 2 6 6 0 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 1 9 2 6 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 3 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中央区道修町 3 丁目 1 番 8 号

氏 名

塩野義製薬株式会社